

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

16.11.2004

RECD 13 JAN 2005

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 4 1 2 4 5  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 3 4 1 2 4 5 ]

出 願 人  
Applicant(s): 第一製薬株式会社

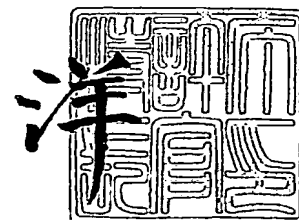
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 7 0 3 7

【書類名】 特許願  
【整理番号】 T03093001A  
【提出日】 平成15年 9月30日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 9/02  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号  
                    第一製薬株式会社 東京研究開発センター内  
                    杉浦 健之  
    【氏名】  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000002831  
    【氏名又は名称】 第一製薬株式会社  
    【代表者】 森田 清  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 005131  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列で表される DNA。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の DNA の DNA 配列において 1 ないし数個の DNA の欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつ細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードする DNA。

**【請求項 3】**

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有する DNA、該 DNA の相補鎖、請求項 1 または 2 に記載の DNA の部分塩基配列で表される DNA および該 DNA の相補鎖のうちすくなくともいずれか 1 つにストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA。

**【請求項 4】**

以下の群より選ばれる DNA であって、請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有する DNA、該 DNA の相補鎖、請求項 1 または 2 に記載の DNA の部分塩基配列で表される DNA および該 DNA の相補鎖のうちすくなくともいずれか 1 つを増幅するためのプライマーおよび／または検出するためのプローブである請求項 3 に記載の DNA；

(i) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列で表される DNA、

(i i) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列で表される DNA、

(i i i) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列で表される DNA

および

(i v) 配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列で表される DNA。

**【請求項 5】**

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有する組換えベクター。

**【請求項 6】**

プラスミド FERM BP-8419 号。

**【請求項 7】**

請求項 5 に記載の組換えベクターまたは請求項 6 に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体。

**【請求項 8】**

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。

**【請求項 9】**

請求項 2 に記載の DNA がコードする蛋白質。

**【請求項 10】**

請求項 5 に記載の組換えベクターまたは請求項 6 に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、請求項 8 または 9 に記載の蛋白質の製造方法。

**【請求項 11】**

請求項 8 または 9 に記載の蛋白質または該蛋白質の断片を抗原とする抗体。

**【請求項 12】**

請求項 8 または 9 に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と請求項 8 または 9 に記載の蛋白質との相互作用を可能にする条件下で、細胞増殖促進活性の存在、非存在または変化を検出することにより、該化合物が請求項 8 または 9 に記載の蛋白質の細胞増殖促進活性を阻害するか否かを判定することを特徴とする同定方法。

**【請求項 13】**

請求項 8 または 9 に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法であって、請求項 8 または 9 に記載の蛋白質、請求項 1 または 2 に記載の DNA、請求項 3 または 4 に記載の DNA、請求項 5 に記載の組換えベクターまたは請求項 6 に記載のプラスミド、請求項 7 に記載の形質転換体および請求項 11 に記載の抗体のうちすくなくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする同定方法。

**【請求項 14】**

ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法であって、ある組織における請求項 1 または 2 に記載の DNA の発現量を測定することを特徴とする判定方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の判定方法であって、ある組織における請求項 1 または 2 に記載の DNA の発現量が、対照である正常大腸由来組織における請求項 1 または 2 に記載の DNA の発現量の 3 倍以上である場合に、ある組織が大腸癌由来組織であると判定することを特徴とする判定方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の判定方法であって、ある組織における請求項 1 または 2 に記載の DNA の発現量を以下の工程により測定することを特徴とする判定方法；

(i) ある組織に含まれる RNA を鋳型に、逆転写反応を行う工程、

(i i) 逆転写反応により合成された cDNA を鋳型に、配列表の配列番号 5 および 6 に記載の塩基配列で表される DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程  
および

(i i i) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅された DNA の量を測定する工程。

【請求項 17】

請求項 3 または 4 に記載の DNA および請求項 11 に記載の抗体のうち少なくともいずれか 1 つを含有することを特徴とする大腸癌の判定キットであって、請求項 14 から 16 のいずれか 1 項に記載の判定方法に用いることを特徴とする大腸癌の判定キット。

【請求項 18】

請求項 8 または 9 に記載の蛋白質の阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】テトラヒドロ葉酸合成酵素遺伝子

【技術分野】

【0001】

本発明は、テトラヒドロ葉酸合成酵素遺伝子、該遺伝子に係るDNA、該DNAがコードする蛋白質に関する。また、該DNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにハイブリダイズするDNAに関する。さらに、該遺伝子に係るDNAを含有する組換えベクター、該ベクターを含有する形質転換体、該形質転換体を用いた該蛋白質の製造方法、該蛋白質に対する抗体に関する。また、該蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法に関する。さらに、ある組織が大腸癌由来組織であるかを判定する方法に関する。また、該蛋白質の阻害剤を含んでなる癌の防止剤および／または治療剤に関する。さらに、該遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにハイブリダイズするDNAおよび／または該抗体を含有する大腸癌の判定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

テトラヒドロ葉酸合成酵素（以後、C1-THFSという）は、様々な代謝反応に必要なC1基を供与するテトラヒドロ葉酸誘導体を合成する酵素である（非特許文献1、以後、テトラヒドロ葉酸をTFとテトラヒドロ葉酸誘導体をTF誘導体という）。具体的にはTF誘導体は、プリン、チミジル酸、ヒスチジンおよびパントテン酸等の生合成反応にC1基を供与する。すなわちTFおよびTF誘導体は、核酸代謝およびアミノ酸代謝等に深く関与している。そのためTFおよびTF誘導体は、細胞分裂が盛んな組織に多くみられ、細胞増殖および成長に不可欠である。

【0003】

C1-THFSは、3種の機能を有するトリ酵素である。具体的には、C1-THFSは、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素（10-formyl-THF synthetase、EC 6.3.4.3）、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ（5, 10-methenyl-THF cyclohydrolase、EC 3.5.4.9）および5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ（5, 10-methylene-THF dehydrogenase、EC 1.5.1.5）の機能を有する。C1-THFSは、これらの機能を発揮することにより、様々な代謝反応に必要なTF誘導体の合成を促進する。

【0004】

C1-THFSは、ヒト、マウス、酵母等の真核生物、大腸菌等の原核生物など様々な生物種を対象に、その解析が進められている（非特許文献2-5）。酵母については、その細胞質およびミトコンドリアに存在し機能するC1-THFSの存在が知られている。また、ヒトについては、その細胞の細胞質に存在し機能するC1-THFSが知られている。

【0005】

しかし、ヒトについてその細胞のミトコンドリアに存在し機能するC1-THFSは知られていない。また大腸癌組織において正常大腸組織と比較し発現が亢進するヒトC1-THFS遺伝子も知られていない。

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

【0006】

【非特許文献1】ハム（Hum DW）ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ（The Journal of Biological Chemistry）」、1988年、第263巻、第31号、p. 15946-15950。

## 【0007】

【非特許文献2】スタベン (Staben, C) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1984年、第261巻、p. 4629-4637。

## 【0008】

【非特許文献3】シャノン (Shannon, K. W.) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1986年、第261巻、p. 12266-12271。

## 【0009】

【非特許文献4】シグベン (Thigpen, A. E.) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1990年、第265巻、p. 7907-7913。

## 【0010】

【非特許文献5】デブ (Dev, I. K.) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1978年、第253巻、p. 4245-4253。

## 【0011】

【非特許文献6】ラジら (Raj SK) ら「バイオケミストリ アンド モレキュラ バイオロジ インターナショナル (Biochemistry and molecular biology international)」、第44巻、第1号、p. 89-95。

## 【0012】

【非特許文献7】フローマンら (Frohman M. A. et al.) 「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1988年、第85巻、第23号、p. 8998-9002。

## 【0013】

【非特許文献8】「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1977年、第74巻、p. 5463-5467。

## 【0014】

【非特許文献9】「メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)」、1980年、第65、p. 499-。

## 【0015】

【非特許文献10】クラロス (Claros MG) ら、ヨーロピアン ジャーナル オブ バイオケミストリ (European Journal of Biochemistry)、1996年、第241巻、第3号、p. 779-786。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0016】

本発明が解決しようとする課題は、新規C1-THFS遺伝子に係るDNAおよび該DNAがコードする蛋白質を見出して提供することである。さらに、該遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにハイブリダイズするD

NAを提供することも課題に含まれる。また、該遺伝子に係るDNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを用いて形質転換させてなる形質転換体、該蛋白質に対する抗体、該蛋白質の製造方法および該蛋白質の細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法を提供することも課題に含まれる。さらに、該遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにハイブリダイズするDNAおよび／または該抗体を含有する大腸癌の判定キットおよびある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法を提供することも課題に含まれる。また、大腸癌の防止剤および／または治療剤を提供することも課題に含まれる。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは上記課題のために鋭意努力し、新規C1-THFS遺伝子を見出し、該遺伝子に係るDNAを用いて新規C1-THFSを取得することに成功した。そして、該DNAの塩基配列を解析することにより、該C1-THFSが、細胞質からミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアにおいて機能することを見出した。また、該C1-THFSが細胞増殖促進活性を有することを実証した。さらに、該C1-THFS遺伝子の発現が、大腸癌組織において正常大腸組織と比較し有意に亢進することを実証して、本発明を完成させた。

【0018】

すなわち、本発明は、

- (1) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNA。
- (2) (1)に記載のDNAのDNA配列において1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつ細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードするDNA。
- (3) (1)または(2)に記載のDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、(1)または(2)に記載のDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。
- (4) 以下の群より選ばれるDNAであって、(1)または(2)に記載のDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、(1)または(2)に記載のDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つを増幅するためのプライマーおよび／または検出するためのプローブである(3)に記載のDNA；
  - (i) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるDNA、
  - (i i) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列で表されるDNA、
  - (i i i) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列で表されるDNAおよび
  - (i v) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列で表されるDNA。
- (5) (1)または(2)に記載のDNAを含有する組換えベクター。
- (6) プラスミド FERM BP-8419号。
- (7) (5)に記載の組換えベクターまたは(6)に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体。
- (8) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。
- (9) (2)に記載のDNAがコードする蛋白質。
- (10) (5)に記載の組換えベクターまたは(6)に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、(8)または(9)に記載の蛋白質の製造方法。
- (11) (8)または(9)に記載の蛋白質または該蛋白質の断片を抗原とする抗体。
- (12) (8)または(9)に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と(8)または(9)に記載の蛋白質との相互作用を可能にする条件下で、細胞増殖促進活性の存在、非存在または変化を検出することにより、該化合物が(8)または(9)に記載の蛋白質の細胞増殖促進活性を阻害するか否かを判

定することを特徴とする同定方法。

(13) (8) または (9) に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法であって、(8) または (9) に記載の蛋白質、(1) または (2) に記載の DNA、(3) または (4) に記載の DNA、(5) に記載の組換えベクターまたは (6) に記載のプラスミド、(7) に記載の形質転換体および (11) に記載の抗体のうち少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする同定方法。

(14) ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法であって、ある組織における (1) または (2) に記載の DNA の発現量を測定することを特徴とする判定方法。

(15) (14) に記載の判定方法であって、ある組織における (1) または (2) に記載の DNA の発現量が、対照である正常大腸由来組織における (1) または (2) に記載の DNA の発現量の 3 倍以上である場合に、ある組織が大腸癌由来組織であると判定することを特徴とする判定方法。

(16) (15) に記載の判定方法であって、ある組織における (1) または (2) に記載の DNA の発現量を以下の工程により測定することを特徴とする判定方法；

(i) ある組織に含まれる RNA を鋳型に、逆転写反応を行う工程、

(i i) 逆転写反応により合成された c DNA を鋳型に、配列表の配列番号 5 および 6 に記載の塩基配列で表される DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程および

(i i i) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅された DNA の量を測定する工程。

(17) (3) または (4) に記載の DNA および (11) に記載の抗体のうち少なくともいずれか 1 つを含有することを特徴とする大腸癌の判定キットであって、(14) から (16) のいずれか 1 項に記載の判定方法に用いることを特徴とする大腸癌の判定キット。

(18) (8) または (9) に記載の蛋白質の阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤。

【発明の効果】

【0019】

本発明は、癌細胞において正常細胞と比較し発現が亢進している新規 C1-THFS 遺伝子を提供するものである。本遺伝子に係る DNA は、細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードする。本特性を利用した新規医薬組成物、診断手段の提供は、大腸癌の臨床・基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

(遺伝子の取得)

本遺伝子に係る DNA は、自体公知の DNA クローニング方法、RT-PCR 法（非特許文献 6）および RACE 法（非特許文献 7）等を用いて、取得され得る。例えば、RT-PCR 法を用いる場合には、まず本遺伝子に係る DNA の発現が確認されている適当な起源から全ての RNA を自体公知の RNA 調整法を用いて抽出する。本遺伝子は、ヒト大腸癌組織において正常大腸組織と比較し、その発現が亢進していることより、該起源としてヒト大腸癌組織が例示される。次に、抽出された RNA から、自体公知の逆転写酵素反応により cDNA を合成する。逆転写酵素反応用のプライマーとしては、オリゴ (dT) プライマー、ランダムプライマー等が例示できる。これらのプライマーは、常法に従って合成により得ることができる。合成された cDNA を、cDNA の塩基配列に特有なプライマー（センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの 2 種類のプライマー）を用いて、自体公知の PCR 法により増幅する。PCR 用のプライマーは、cDNA の塩基配列情報に基づいて適宜設計でき、常法に従って合成により得ることができる。センスプライマーとしては、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列からなる DNA を例示することができる。アンチセンスプライマーとしては、配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる DNA を例示することができる。増幅した cDNA の単離精製は、常法により行うことができる。例えば、ゲル電気泳動法により実施可能である。増幅後、単離精製された c



DNAとして、本遺伝子に係るDNAを取得することができる。

【0021】

取得されたDNAの塩基配列は、公知の方法によって決定することができる。例えば、ジデオキシ法（非特許文献8）、マクサム・ギルバート法（非特許文献9）を用いて塩基配列を決定することができる。

【0022】

（遺伝子の機能）

本遺伝子は、ORF 2934 bp、978アミノ酸をコードする新規の遺伝子であることが明らかとなった。

【0023】

本遺伝子に係るDNAの5'末端部分の一部（以後、N末端部分DNAという）が欠落したDNA（以後、N末端欠損DNAという）の塩基配列は、ヌクレオチドデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に登録され、公開されている（図1）。N末端欠損DNAは、既知のヒトC1-THFS遺伝子に係るDNAと、塩基配列上において高い相同性を有することが分かっている（図2）。

【0024】

N末端欠損DNAと既知のヒトC1-THFS遺伝子に係るDNAとのアミノ酸配列上における相同性検索の結果、N末端欠損DNAは、既知のヒトC1-THFSが有する3種類の酵素活性に対応する既知ヒトC1-THFS遺伝子上の部分配列のうち、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分配列に対し75.7%程度の相同性を有し、5, 10-メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼの酵素活性に対応する部分配列に対し33.2%程度の相同性を有し、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分配列に対し33.2%程度の相同性を有することが、明らかとなった。

【0025】

また、ヒトC1-THFSオルソログが既に発見されている。ヒトC1-THFSオルソログ遺伝子と既知のヒトC1-THFS遺伝子との塩基配列上における相同性検索の結果、ヒトC1-THFSオルソログ遺伝子は、既知ヒトC1-THFSが有する3種類の酵素活性に対応する部分配列のうち、5, 10-メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼの酵素活性に対応する部分配列および5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分配列への相同性と比較し、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分配列への相同性が高いことが分かっている。さらに、ヒトC1-THFSオルソログ遺伝子がコードする蛋白質は、既知のヒトC1-THFSが有する3種類の酵素活性すべてを有していることも、明らかとなっている。

【0026】

すなわち、5, 10-メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼの酵素活性に対応する部分構造および5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分構造は、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分構造に比べ、DNA変異等の原因によるアミノ酸配列の変化に対し、活性が失われにくい部分構造であると考えられている。

【0027】

これらのことより、本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質も、C1-THFSが有する3種類の酵素活性すべてを有していると発明者は考えている。すなわち本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質は、ヒトC1-THFSのアイソザイムであると考えられる。

【0028】

一方、リボソームにおいて合成された蛋白質の中には、N末端部分に特有のターゲット配列を有しているものがある。それら蛋白質は、ターゲット配列に応じてゴルジ体、ミトコンドリアなどの細胞小器官へ輸送されることが分かっている。ミトコンドリアへ輸送される全ての蛋白質が有するターゲット配列に、アミノ酸配列上のコンセンサスがあるとい

うことではない。しかし、ミトコンドリアへ輸送される全ての蛋白質が有するターゲット配列は、共通して、塩基性アミノ酸の含有率が高く、ターゲット配列全体は疎水的であることがわかっている（非特許文献10）。そこで、本傾向を指標に、アミノ酸配列が明らかな任意の蛋白質がミトコンドリアへ輸送されるためのターゲット配列を有しているか否かを予測することは、可能である。

#### 【0029】

N末端DNAがコードするポリペプチドがターゲット配列を有するか否かを、そのアミノ酸配列から予測した結果、N末端DNAがコードするポリペプチドは、ターゲット配列を有していることが明らかとなった。よって、本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質は、リボソームにおいて合成された後、ミトコンドリアへ輸送され、さらにミトコンドリアにおいてターゲット配列に係るペプチドが切断され、その結果、ターゲット配列に係るペプチドが除かれたポリペプチドが成熟蛋白質として機能すると発明者は考えている。

#### 【0030】

また、本遺伝子に係るDNAをヒト胎児腎臓由来の細胞株にリボソームを用いて導入した結果、導入しない場合と比較し、細胞増殖が促進された。本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質が、C1-THFSの3種類の酵素活性を有していると予想されることから、細胞増殖促進の結果は、本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質が、核酸合成に関与していると発明者は考えている。

#### 【0031】

本遺伝子に係るDNAは、N末端欠損DNAと比較し、N末端部分DNA、すなわち細胞質からミトコンドリアへの移行のためのターゲット配列に係るDNAを含むDNAを有している。このことは、本遺伝子が、既知の細胞質に存在し機能しているヒトC1-THFSをコードする遺伝子とは異なり、ミトコンドリア局在性のヒトC1-THFSをコードする遺伝子であることを意味している。また、正常大腸組織と比較し大腸癌組織において、本遺伝子の発現が有意に亢進している。以上のことから、本発明はC1-THFSの代謝反応のさらなる解明に寄与するものである。また、本遺伝子は、従来のC1-THFS遺伝子にはない抗癌剤が標的とする蛋白質をコードする遺伝子として、新たな抗癌剤の開発に寄与することができる。

#### 【0032】

(DNA)

本発明に係るDNAは、配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNAである。

#### 【0033】

また、本発明に係るDNAには、上記DNAのDNA配列において1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつ細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードするDNAも含まれる。該DNAは、天然に存在するものであってよく、また天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たDNAであってもよい。変異を導入する手段は自体公知であり、エキソヌクレアーゼを用いた欠失変異体の作製法、部位特異的突然変異誘発法などが挙げられる。

#### 【0034】

本明細書において、上記DNAを本遺伝子に係るDNAという。

#### 【0035】

また、本発明に係るDNAには、本遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、本遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにストリンジントな条件でハイブリダイズするDNAも含まれる。該DNAは、その最小単位として好ましくは5個以上のヌクレオチド、より好ましくは10個以上のヌクレオチド、さらに好ましくは20個以上のヌクレオチドからなるDNAである。該DNAは、該DNAの塩基配列情報に基づいて、自体公知の化学合成方法により製造可能である。該DNAは、本遺伝子に係るDNAを増幅するためのプライマーまたは本遺伝子に係るDNAの検出用プローブなどに用いられる。

## 【0036】

また、本発明に係るDNAには、本遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、本遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つを増幅するためのプライマーおよび／または検出するためのプローブであるDNAも含まれる。該DNAは、本遺伝子の取得、本遺伝子の転写物の測定などに用いられる。例えば、該DNAは、配列表の配列番号3から6のいずれか1つに記載の塩基配列からなるDNAである。例えば、配列表の配列番号3および4に記載の塩基配列からなるDNAは、本遺伝子に係るDNAの取得の際、本遺伝子に係るDNAを含有するDNAおよび該DNAの相補鎖を増幅するためのプライマーとして用いられる。例えば、配列表の配列番号5および6に記載の塩基配列からなるDNAは、本遺伝子に係るDNAの断片および該断片DNAの相補鎖を増幅するためのプライマーならびに本遺伝子に係るDNAおよび該DNAの相補鎖を検出するためのプローブとして用いられる。

## 【0037】

本明細書において、上記DNAのうち本遺伝子に係るDNAを除くDNAを本遺伝子等にハイブリダイズするDNAという。

## 【0038】

(蛋白質)

本発明の一つの態様は、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。さらに、本発明に係る蛋白質には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNAのDNA配列において1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有するDNAがコードする蛋白質であって、細胞増殖促進活性を有する蛋白質も含まれる。

## 【0039】

これらの蛋白質は、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。例えば、N末端やC末端に別の蛋白質等を、直接的にまたはリンカー蛋白質を介して間接的に遺伝子工学的手法などを用いて付加することにより標識化した蛋白質も本発明に含まれる。付加される蛋白質等としては、例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagなどのタグペプチド類、フルオレセインイソチオシアネート等の蛍光物質類等が例示できる。これら蛋白質等の付加により、本発明に係る蛋白質の精製、検出を容易にすることが可能となる。

## 【0040】

本発明が提供する蛋白質は、該蛋白質をコードするDNAを遺伝子工学的手法により発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または生体生物由来の生物学的試料から調整したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってよい。

## 【0041】

本発明が提供する蛋白質は、該蛋白質の活性を阻害する阻害剤のスクリーニングに有用である。例えば、該蛋白質の活性として、細胞増殖促進活性が挙げられる。

## 【0042】

本遺伝子を提供する本発明を完成させることにより、本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質を、そのC1-THF活性を保持したまま、発現させることができる。また、該蛋白質の精製、該蛋白質を標的とした薬剤スクリーニングを可能にすることができる。

## 【0043】

一方、本遺伝子に係るDNAは、N末端欠損DNAと比較し、N末端部分DNAすなわち細胞質からミトコンドリアへの移行のためのターゲット配列に係るDNAおよび構造遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAを有している。よって、仮にN末端欠損DNAを用いて動物細胞等において強制的に該DNAを発現させた場合、N末端欠損DNAは構造遺伝子にかかるDNAを全て含んでいないため、発現させた蛋白質がC1-T

HFS活性を示さないと発明者は考えている。また、N末端欠損DNAはミトコンドリアへの移行のためのターゲット配列に係るDNAを有していないため、発現させた蛋白質が細胞質からミトコンドリアへ移行しそこでC1-T HFS活性を呈することも考えにくい。

#### 【0044】

(組換えベクター)

本発明は一つの態様として、本遺伝子に係るDNAを含有する組換えベクターを提供する。組換えベクターは、本遺伝子に係るDNA等を適当なベクターDNAに挿入することによって得ることができる。

#### 【0045】

ベクターDNAは、導入する細胞の種類等により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落したものでもよい。例えば、プラスミド、バクテリアファージおよびウイルス由来のベクターが例示できる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドおよび酵母由来のプラスミドが例示される。バクテリアファージDNAとしては、λファージなどが例示される。ウイルス由来のベクターDNAとしては、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、パポバウイルス、SV40およびバキュロウイルスなどが例示される。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来のベクターDNAなどが例示される。あるいは、これらを組合わせて作成されるベクターDNA(コスミドなど)が例示される。組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー、選択マーカー等を構成要素とし、これらを自体公知の方法により組合わせて作製される。選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などが例示できる。

#### 【0046】

ベクターDNAに目的の遺伝子を組み込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理して目的の遺伝子を特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的の遺伝子に適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望のベクターが得られる。

#### 【0047】

後述の実施例に示すpCMV-Tag4A-hC1S(図3)では、ベクターDNAとして、pCMV-Tag4(STRATAGEN社製)を用いた。pCMV-Tag4A-hC1Sは、特許生物寄託センターに、FERM BP-8419号として寄託されている。プラスミド FERM BP-8419号も本発明に含まれる。

#### 【0048】

(形質転換体)

本発明は一つの態様において、本発明に係る組換えベクターを、宿主に導入して得られる形質転換体を提供する。ベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係る蛋白質を提供することが可能である。該形質転換体には、本発明に係るDNA以外の所望の遺伝子を組み込んだベクターDNAの1つまたは2つ以上をさらに導入することもできる。宿主に導入するベクターDNAは、1種のベクターであってもよいし、2種以上のベクターDNAであってもよい。

#### 【0049】

宿主としては、原核生物および真核生物のいずれをも用いることができる。原核生物としては、大腸菌、枯草菌などが例示できる。真核生物としては酵母、昆虫細胞、あるいはサル腎由来細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウスL細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞、293EBNA細胞などの動物細胞が例示できる。好ましくは動物細胞を用いる。より好ましくは、ヒト細胞を用いる。

## 【0050】

形質転換は、自体公知の方法により行うことができる。好ましくは、遺伝子の安定性を考慮し、宿主の染色体へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を用いた自立複製系を利用する。本発明が提供するDNAの導入は、それ自体公知の方法により行われる。例えば、リン酸カルシウム法、エレクトポレーション法、リポフェクション法が例示できるが、これらの方法に限定されない。導入効率および簡便性の観点から、好ましくはリポフェクション法が挙げられる。なお、後述の実施例では、pCMV-Tag4A-hCISを293細胞へリポフェクション法により導入し、形質転換させた結果得られた形質転換体を用いて、本発明に係る蛋白質を発現させた。293細胞は、アデノウイルス5型の癌遺伝子E1でトランスフォームされたヒト胎児腎細胞を意味する。

## 【0051】

## (蛋白質の製造方法)

本発明は一つの態様において、本発明に係る形質転換体を培養する工程を含む本発明に係る蛋白質の製造方法を提供する。本発明に係る蛋白質の発現は、無細胞蛋白質発現系を用いて行うことができる。その他、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術を用いて、本発明に係る蛋白質を発現させることができる。例えば、本発明に係る形質転換体を培養し、次いで培養で得られる培養物から目的とする蛋白質を回収することにより、本発明に係る蛋白質を製造することができる。本発明に係る形質転換体の培養は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件および培養方法で行いことができる。培養は、形質転換体により発現される該蛋白質の細胞増殖促進活性を指標にして実施することができる。あるいは、宿主中または宿主外に産生された該蛋白質量を指標にしてもよい。発現させた蛋白質は、自体公知の精製方法を用いて、精製回収することができる。例えば、分子篩、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の組み合わせにより、精製回収することができる。その他、硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収することができる。好ましくは、本発明に係る蛋白質に対する抗体を作製し、本発明に係る蛋白質の該抗体への特異的な吸着性を利用し、精製回収することができる。

## 【0052】

## (抗体)

本発明は一つの態様において、本発明に係る蛋白質に対する抗体を提供する。抗体は、本発明に係る蛋白質またはその断片を抗原として用いて作製する。抗原は、該蛋白質またはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。該蛋白質に特異的な抗体を作製するためには、該蛋白質および/またはその断片に固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも本発明に係る蛋白質またはその断片に係るアミノ酸配列と同一または相同である必要がなく、該蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上不連続であっても、露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に本発明が提供する蛋白質および/またはその断片を特異的に結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定できる。

## 【0053】

抗体は、自体公知の抗体作製方法を用いて、産生される。抗体を産生するためには、本発明が提供する蛋白質またはその断片を、アジュバンドの存在または非存在下で、単独または担体に結合して動物に投与し、動物に対して体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用を起こさず抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得する。好ましい抗体回収法としては、免疫アフィニティクロマトグラフ

ィー法が例示できる。

#### 【0054】

モノクローナル抗体を生産するためには、上記免疫手段を施された動物から抗体産生細胞（例えば脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、本発明が提供する蛋白質でおよび／またはその断片を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

#### 【0055】

かくして得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明が提供する蛋白質の精製用抗体、標識マーカー等として用いることができる。また、該ポリクローナル抗体または該モノクローナル抗体は、直接本発明が提供する蛋白質と結合し、その活性を制御することができる。よって、本発明に係る蛋白質の活性が関与する疾病の治療または／および防止のために有用である。例えば、ヒト正常大腸組織と比較してヒト大腸癌組織において、本遺伝子に係るDNAはその発現が亢進しているため、該ポリクローナル抗体または該モノクローナル抗体は、大腸癌の治療または／および防止に有用である。さらには該ポリクローナル抗体または該モノクローナル抗体は、該蛋白質の標識マーカーとして大腸癌の診断手段を提供することもできる。

（化合物の同定方法）

本発明は一つの態様において、本発明に係る蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法を提供する。該化合物の同定方法は、本発明に係る蛋白質、本発明に係るDNA、本発明に係る組換えベクターまたは本発明に係るプラスミド、本発明に係る形質転換体および本発明に係る抗体のうちすくなくともいずれか1つを用いて、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。本発明に係る同定方法により、該蛋白質の立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別または該抗体を利用した抗体認識物質の選別などが可能である。該同定方法により同定された化合物は、本発明に係る蛋白質の活性が関与する疾病の治療または／および防止のために有用である。ヒト正常大腸組織と比較してヒト大腸癌組織において本遺伝子に係るDNAはその発現が亢進している。よって、該化合物は大腸癌の治療または／および防止などに有用である。

#### 【0056】

例えば、本発明に係る蛋白質の細胞増殖促進活性を測定する実験系において、該蛋白質と被検化合物の相互作用を可能にする条件下で、該蛋白質と被検化合物とを共存させて該活性を測定する。ついで、被検化合物の非共存下での測定結果との比較における該活性の存在、非存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現などを検出することにより、該蛋白質の該活性を阻害する化合物を同定可能である。活性の測定は、活性の直接的な検出により行うこともできるし、例えば活性の指標となるシグナルを実験系に導入して該シグナルを検出することにより実施可能である。シグナルとして、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagなどのタグペプチド類等を用いることができる。

#### 【0057】

被検化合物を共存させた場合の該蛋白質の該活性を、被検化合物を共存させなかった場合の該蛋白質の該活性と比較することにより、該被検化合物が該活性に及ぼす効果を測定することができる。該被検化合物を共存させた場合の該活性が、該被検化合物を共存させなかった場合の該蛋白質の該活性と比較して低減した場合には、該被検化合物には該蛋白質の活性を阻害する作用があると判定できる。

#### 【0058】

一例として、本発明に係る蛋白質の細胞増殖促進活性を指標にして、該活性に影響を与え得る化合物を選別することができる。該細胞増殖促進活性は、本発明に係る蛋白質が発現する細胞を培養し、培養後に増殖した細胞数を計測することで定量化が可能である。細胞数は、クリスタルパイオレット、ニュートラルレッド等を用いて、生細胞を染色するこ

とにより計測され得る。また、生細胞による放射標識されたチミジンの取り込みを指標に、細胞数を計測することも可能である。

#### 【0059】

##### (大腸癌の判定方法)

また、本発明は一つの態様において、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法であって、ある組織における本遺伝子に係るDNAの発現量を測定することの特徴とする判定方法を提供する。すなわち、本遺伝子に係るDNAは、大腸癌組織において正常大腸組織と比較し、有意にその発現が亢進している。よって、本遺伝子に係るDNAの発現量を指標に、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定することが可能である。

#### 【0060】

披検試料としては、本発明で提供される遺伝子および／またはその変異遺伝子の核酸および／または核酸断片を含むものである限り制限されない。例えば大腸組織細胞、大腸組織生検などの生体生物由来の生物学的試料を披検試料として例示できる。該核酸として、本遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、本遺伝子に係るDNAの断片、該断片DNAの相補鎖およびこれらDNAが転写されてなるRNAなどが例示される。披検試料は、試料中に含まれる核酸の検出を容易ならしめる種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットプロットングなどの方法を用いて調製され得る。

#### 【0061】

該核酸の検出および該核酸量の測定は、自体公知の遺伝子検出方法および測定方法を用いて行い得る。該検出方法として、例えばin situハイブリダイゼーション法、ノザンプロット法などが例示される。該測定方法として、ノザンプロット法、定量的RT-PCR法および分光分析法などが例示される。例えば、次の工程により本遺伝子に係るDNAの発現量を測定することが可能である。(i)ある組織に含まれるRNAを鋳型に、逆転写反応を行う工程、(ii)逆転写反応により合成されたcDNAを鋳型に、配列表の配列番号5および6に記載の塩基配列で表されるDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程および(iii)ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNAの量を測定する工程。

#### 【0062】

該検出方法においては、本発明に係る遺伝子またはその変異遺伝子の同定および／または該遺伝子に係るDNAの増幅の実施に、本遺伝子に係るDNAまたは該DNAの相補鎖の断片であってプローブとしての性質を有するものまたはプライマーとしての性質を有するものが有用である。プローブとしての性質を有するDNA断片とは、本遺伝子に係るDNAのみに特異的にハイブリダイゼーションできるDNAを意味する。プライマーとしての性質を有するものは、本遺伝子に係るDNAのみを特異的に増幅できるDNAを意味する。プローブまたはプライマーとしては、塩基配列長が一般的に5ないし50ヌクレオチド程度であるものが好ましく、10ないし35ヌクレオチド程度であるものがより好ましく、15ないし30ヌクレオチド程度であるものがさらに好ましい。一般的に、プローブは標識されたものを用いるが、非標識であってもよい。適当な標識としては、放射性同位体、ビオチン、蛍光物質、化学発光物質、酵素、抗体などが例示できる。プローブを標識する方法は、ニックトランスレーション、ランダムプライミングまたはキナーゼ処理を利用する方法などを例示することができる。例えば、該プローブおよび／またはプライマーとして、本発明に係るポリヌクレオチドが例示される。

#### 【0063】

また、上記同定方法における発現量は、対照である正常大腸由来組織における本遺伝子に係るDNAの発現量と比較し、2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは4倍以上、さらに好ましくは8倍以上である場合に、ある組織が大腸癌由来組織であると判定することが可能である。後述の実施例において、大腸癌細胞における該DNAの発現量は正常大腸細胞における該DNAの発現量のおよそ2.38倍であった。

##### (大腸癌の判定キット)

また、本発明は一つの態様において、本遺伝子等にハイブリダイズするDNAおよび本

発明に係る抗体のうち少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする大腸癌の判定キットを提供する。例えば、ヒト大腸癌組織においてヒト正常大腸組織と比較して本遺伝子に係るDNAの発現の亢進が見られることから、被検組織における該DNAの発現産物を、本発明に係る大腸癌の判定キットに含有されるDNAをプローブとして用いることにより検出し、該DNAの発現量を測定することにより、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定することが可能である。該判定キットには、緩衝液、塩、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでいてもよい。なお、製剤化にあたっては、本遺伝子等にハイブリダイズするDNAおよび該抗体の性質に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

(大腸癌の防止剤および／または治療剤)

本発明は一つの態様において、本発明に係る蛋白質の阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤を提供する。本発明に係る蛋白質の阻害剤としては、本発明に係る抗体および本発明に係る化合物の同定方法により同定された化合物が例示される。大腸癌細胞において本遺伝子にかかるDNAの発現が正常大腸細胞と比較し亢進しているため、本発明に係る蛋白質の阻害剤は大腸癌の防止および／または治療に有用である。

#### 【0064】

医薬の製造には、1種または2種以上の医薬用担体を用いることが好ましい。本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.0001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%の範囲とするのが適当である。

#### 【0065】

医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤や賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択される。

#### 【0066】

例えば、水、医薬に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

#### 【0067】

所望により、通常の製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調整することもできる。

#### 【0068】

安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体などを例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤などと組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸などのいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトールなどの糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン酸、ヒアルロン酸などの多糖類などおよびそれらの誘導体などのいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセスロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれでも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシ



ルエステル系、脂肪酸グリセリド系などが包含される。

【0069】

緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩）などを例示できる。

【0070】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンなどを例示できる。

【0071】

キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸などを例示できる。

【0072】

本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調整した後に使用することも可能である。

【0073】

医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、本発明の医薬組成物の有効性、投与形態、疾病の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用有無等）および担当医師の判断により適宜選択することが望ましい。

【0074】

処方投与形態に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られたものを用いればよい。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。例えば、他の抗腫瘍用医薬の有効成分等を配合してもよい。

【0075】

投与形態は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与形態を選択する。例えば、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内等に投与することもできる。大腸癌組織に直接投与することもできる。

【0076】

医薬形状は投与形態に応じて選択することができ、遺伝子治療剤、シクロデキストリン等の包接体、溶液剤、けん濁剤、脂肪乳剤、散剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤丸剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、座剤、吸入剤、点眼剤、点耳剤等の作製も可能である。しかし、本発明の医薬の形態は、これに限定されない。

【0077】

製剤化にあたっては、その形態に応じて適切な製剤用添加物を用いることができ、常法に従って製剤化することができる。

【0078】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、目的とする物質を溶媒に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

【0079】

シクロデキストリン包接化は、例えば目的とする物質を溶媒に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を適宜選択すればよい。

【0080】

注射用の溶液剤は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物か

らなる担体を用いて調製可能である。

【0081】

けん濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0082】

脂肪乳剤化は、例えば目的とする物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油等の植物油、MCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に。必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これらを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖等）が例示される。

【0083】

散剤、丸剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、点滴剤、座剤、吸入剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸入剤、経粘膜吸収剤等についても、通常用いられる方法により調製可能である。

【実施例】

【0084】

（正常大腸細胞と比較し、大腸癌細胞において発現が亢進している遺伝子の同定）

正常細胞と比較し、癌細胞において発現が亢進している遺伝子は、バイオエクスプレス（GeneLogic社）のマイクロアレイデータベースを利用して、同定された。マイクロアレイデータベースには、正常大腸組織細胞117サンプル、大腸癌細胞77サンプルの各細胞内の発現プロファイルデータが含まれている。発現プロファイルデータはアフィメトリクスヒト遺伝子オリゴチップHG-U133を用いた各細胞内の発現データベースとして格納されている。正常大腸組織細胞内での発現量よりも大腸癌細胞内での発現量が多い遺伝子のうち、ヌクレオチドデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に遺伝子の全長の塩基配列が登録されていない本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を同定した。117サンプルの正常大腸組織細胞内における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現平均量に対する77サンプルの大腸癌細胞内における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現平均量の比は、約2.38となった。有意水準は、0.000001未満であった。本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量の比を他の癌細胞において同様に調査した結果、乳癌の場合には約1.22（有意水準0.00243）、肺癌の場合には約1.52（有意水準0.0000001未満）、胃癌の場合には約1.98（有意水準0.00003）、膵癌の場合には約1.37（有意水準0.0019）の発現量の比を示した。

（遺伝子の取得）

マイクロアレイデータベースのプローブ配列情報に相当する遺伝子として、公共ヌクレオチドデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）中には、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のN末端欠損DNAの塩基配列が登録されていた。よって、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のN末端DNAの塩基配列は、不明であった。

【0085】

そこで、本発明で提供されるDNAの全長配列を次のように決定した。まず、本発明で提供されるDNAの全長配列を推定した。最初に、N末端欠損DNAの5'末端30ポリヌクレオチドに係る塩基配列をクエリーとして、ヌクレオチドデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に対し相同性検索を行った。検索の結果、ヒトゲノムDNA断片（アクセッション番号、AL035086）と高い相同性を示した。ヒトゲノムDNA断片の塩基配列のうち、N末端欠損DNAの塩基配列と相同性を有する部分配列を除いて得られる塩基配列（以後、塩基配列Aという）を対象として、塩基配列Aに含まれる開始コドンのうち最も5'末端に近く存在する開始コドンと同定し、塩基配列Aのうち該開始コドン以降の部分配列（以後、推定N末端塩基配列という）を同定した。推定N末端塩基配列の配列長は、183であり、61アミノ酸をコードする部分配列であることが推定

された。さらに、N末端欠損DNAの塩基配列をアミノ酸配列に変換したものをクエリーに、ヌクレオチドデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に対して相同性検索を行った。その結果、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のマウスオルソログと推察される遺伝子に係るDNAと高い相同性を示した。該DNAの5'末端部分配列 (配列長183) をアミノ酸配列に変換したものと、推定N末端塩基配列をアミノ酸配列に変換したものとで相同性検索を行ったところ、良好な相同性 (56.1%) を示した。よって、推定N末端塩基配列は、N末端部分DNAの塩基配列であることが推定された。

#### 【0086】

さらに、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のcDNAクローニングを行った。センスプライマーとして配列表の配列番号3に記載の塩基配列からなるDNAを、アンチセンスプライマーとして配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるDNAを使用した。鋳型は、QUICK-Clone cDNA (Clontech社) を用い、DNAポリメラーゼとして、KOD-Plus-DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。PCR増幅反応は、94℃2分間、94℃30秒、68℃4分を40サイクル行い、続いて68℃3分間処理を行った。得られた増幅産物をpCR4Blunt-TOPO Vector (東洋紡社) へライゲーションした。得られた組換えベクター (以後、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCR4Blunt-TOPO Vectorという) に含まれる本遺伝子に係るDNAの塩基配列の決定は、Long-Read Tower (Amersham Biosciences社) を用いて行った。その結果、本遺伝子にかかるDNAの塩基配列は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列であることが判明した。

#### 【0087】

(正常大腸細胞および大腸癌細胞内における発現量比較)

正常大腸細胞における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の転写産物量が、大腸癌細胞における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の転写産物量よりも少ないことを、以下の手順で確認した。まず、大腸癌細胞HCT116及びSW620を大日本製薬より購入し、両細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS、岩城硝子社) を含むDMEM培地 (Invitrogen) で培養した。一方、正常大腸上皮細胞CCD841ConをAmerican Tissue Culture Collectionより購入し、該細胞をACL-4無血清培地で培養した。これらの細胞から、アイソゲン (日本ジーン社) を用いて、全RNAを抽出した。1μgの全RNAから、RNA PCR Kit (AMV社) Ver.2.1 (TAKARA社) を用いて30℃10分、42℃30分、99℃5分、5℃5分の条件の下、逆転写反応を行った。次に逆転写反応で得られたcDNAのPCR増幅反応を行った。反応は、得られたcDNAの1/10が溶解している溶液に、配列表の配列番号5に記載の塩基配列からなるプライマーおよび配列表の配列番号6に記載の塩基配列からなるプライマーを加えて、Advantage polymerase mix (Clontech社) を用いて行った。反応条件は、94℃1.5分、94℃30秒、60℃30秒、72℃1分を30サイクル、最後に72℃3分処理とした。反応液を1%アガロースゲルに供与し、電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色により、PCR増幅産物を検出した。

#### 【0088】

対照として、グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素の発現を、同様の方法で、検出した。その結果、対照のグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素の発現量については、正常大腸細胞および大腸癌細胞間で有意な差異は認められなかった。しかし、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量については、大腸癌細胞内における発現量が正常大腸細胞内における発現量よりも多いことが明らかとなった (図4)。

#### 【0089】

(蛋白質の取得)

本遺伝子に係るDNAを組み込んだ発現ベクターを導入した動物細胞を培養することにより、本遺伝子がコードする蛋白質を発現させ、その分子量を、ウエスタンブロット法を

用いて測定した。発現ベクターとして、pCMV-Tag4 Vector (Stratagene社)を使用した。本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCR4 Blunt-TOPO VectorをBamHIおよびXhoIで切断し得られたDNAフラグメントと、BamHIおよびXhoIで切断されたpCMV-Tag4 Vectorとを混合し、本遺伝子に係るDNA (以後、hC1Sという)を組み込んだ発現ベクター (以後、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4 Vectorという)を得た。動物細胞には、293細胞を用いた。まず、10% FCS含有DMEM培地 (Invitrogen社)で293細胞をサブコンフルエント状態に至るまで、培養した。培養後、培地をオプティMEMI (Invitrogen社)に交換した。交換後、4  $\mu$ gの本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社)を用い、リポフェクション法により、293細胞に導入した。対照として本遺伝子が組み込まれていないpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社)を用い、リポフェクション法により、293細胞に導入した。

#### 【0090】

導入時から5時間経過後、遺伝子導入された細胞の培養液に20% FCS含有オプティMEMI培地を、培養液の最終血清濃度が10%になるように、加えた。更に翌日、遺伝子導入された細胞の培地を10% FCS含有DMEM培地に交換した。交換時から48時間経過後、細胞を溶解するための溶液 (1% トリトンX、50mM Tris塩酸pH 7.4、300mM NaCl、5mM EDTA、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテルEDTAフリー、ロッシュ社)を加え、遺伝子導入された細胞を溶解した。氷冷下30分間放置した後、溶液 (以後、溶解後溶液という)を回収、遠心処理 (15000回転、15分間)した。遠心処理後、上清にBSA処理IgGアガロースゲル (シグマ)を加え、一晚4℃で放置した。翌日、上清に抗FLAGM2アガロースゲル (シグマ社)を加え、3.5時間4℃で抗原抗体反応させた後、洗浄液 (0.1% トリトンX、50mM Tris塩酸pH 7.4、300mM NaCl、5mM EDTA)で3回、リン酸緩衝液で1回洗浄した。抗FLAGM2アガロースゲルと結合した蛋白質は、10% 2-メルカプトエタノール含有サンプル緩衝液で回収した。回収溶液ならびに溶解後溶液を、4-20% SDSゲルに供与し、電気泳動を行った。泳動後、泳動産物をニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell社)へ転写した。転写後、BSAブロッキングを行い、抗FLAGM2抗体 (シグマ社)および過酸化水素脱水素酵素で標識された抗マウスIg抗体 (Amersham社)と泳動産物を反応させ、4-クロロ-1-ナフトールで発色させた。免疫沈降させずに溶解後溶液を直接用いた場合には、本発明で提供される蛋白質を検出することができなかった。しかし、抗FLAGM2アガロースゲルで免疫沈降させた場合には、本発明で提供される蛋白質を、検出できた。検出の結果、本発明で提供される蛋白質の分子量は、約110kDaであることが明らかとなった (図5)。

#### 【0091】

(本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の細胞増殖促進活性)

24および12穴のプレート上に、10% FCS含有DMEM培地を用いて293細胞を播種し、サブコンフルエント状態になるまで培養を行った。培養後、4  $\mu$ gの本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社)を用い、293細胞へ導入した。対照として本発明で提供されるDNAに係る遺伝子が組み込まれていないpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社)を用い、293細胞へ導入した。翌日、細胞を10%FCS含有DMEM培地中、10cmプレートに巻きなおし、G418 (Promega社)を終濃度1mg/mlとなるように、追加した。1mg/ml濃度のG418 (Promega社)を含んだ培地を3ないし4日ごとに交換し、10-14日間培養することによりコロニーを形成させた。形成したコロニーを0.2%クリスタルバイオレットで染色した。その結果、本発明で提供されるDNAに係

る遺伝子を細胞に導入し、強制発現させると、細胞増殖促進させることがわかった。この結果は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質が、細胞増殖促進活性を有することを示すものである(図6)。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のcDNAおよび該遺伝子がコードする蛋白質の一次構造を示す図である。上段にcDNA、下段に蛋白質の一次構造を示す。

【図2】ヒトC1-THFS (Human C-1 tetrahydrofolate synthetase) および本発明で提供されるDNAに係る遺伝子(DK FZP)の一次構造を示す。D/C domainは、5, 10-メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼおよび5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分構造を意味する。S domainは、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分構造を意味する。

【図3】pCMV-Tag4A-hC1Sの構造を示す図である。図中、BamHI 687およびXhoI 3630は、制限酵素BamHIおよびXhoIの認識部位を示す。CMV promoterは、サイトメガロウイルスプロモーター領域、Neor/Kanrは、ネオマイシンおよびカナマイシン耐性遺伝子部位を示す。hC1Sは、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の挿入部位を示す。

【図4】正常大腸細胞および大腸癌細胞内における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量を示す図である。上段に本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量、下段に対照であるグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素遺伝子の発現量を示す。

【図5】本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の発現を確認したウエスタンブロッティングの結果の図である。図中、lysateは293細胞の溶解溶液のサンプルであること、IPPは293細胞の溶解溶液中で抗FLAG抗体により免疫沈降させた後の沈降物のサンプルであることを示す。

【図6】本発明で提供されるDNAに係る遺伝子によりコードされる蛋白質が、細胞増殖を促進することを示す図である。24 well plate→10 cm plateレーンは、24穴のプレートに播種した293細胞に本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を導入後10 cmプレートに播き直したサンプルを示す。12 well plate→10 cm plateレーンは、12穴のプレートに播種した293細胞に本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を導入後10 cmプレートに播き直したサンプルを示す。

【配列表フリーテキスト】

【0093】

配列番号1: (1): (2934) 本蛋白質全長をコードする領域

配列番号1: (1): (183) N末端部分DNA

配列番号1: (184): (2934) N末端欠損DNA

### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> A novel Cl-tetrahydrofolate synthase gene

<130> T03093001A

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

 $\langle 210 \rangle$  1

<211> 2934

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> CDS

<222> (1)..(2934)

<223>

 $\langle 220 \rangle$ 

```
<221> sig_peptide
```

<222> (1)..(93)

**<223>**

$\langle 400 \rangle$  1

atg ggc acg cgt ctg ccg ctc gtc ctg cgc cag ctc cgc cgc ccg ccc 48  
Met Gly Thr Arg Leu Pro Leu Val Leu Arg Gln Leu Arg Arg Pro Pro  
1 5 10 15

cag ccc ccg ggc cct ccg cgc cgc ctc cgt gtg ccc tgt cgc gct agc 96  
Gln Pro Pro Gly Pro Pro Arg Arg Leu Arg Val Pro Cys Arg Ala Ser  
20 25 30

agc ggc ggc ggc gga ggc ggc ggc ggt ggc cgg gag ggc ctg ctt gga 144  
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Gly Leu Leu Gly  
35 40 45

cag cgg cgg ccg cag gat ggc cag gcc cgg agc agc tgc agc ccc ggc 192  
Gln Arg Arg Pro Gln Asp Gly Gln Ala Arg Ser Ser Cys Ser Pro Gly  
50 55 60

ggc cga acg ccc gcg gcg cgg gac tcc atc gtc aga gaa gtc att cag 240  
Gly Arg Thr Pro Ala Ala Arg Asp Ser Ile Val Arg Glu Val Ile Gln  
65 70 75 80

aat tca aaa gaa gtt cta agt tta ttg caa gaa aaa aac cct gcc ttc 288

Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Glu	Lys	Asn	Pro	Ala	Phe	
				85					90					95		
aag	ccg	gtt	ctt	gca	att	atc	cag	gca	ggt	gac	gac	aac	ttg	atg	cag	336
Lys	Pro	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Gln	Ala	Gly	Asp	Asp	Asn	Leu	Met	Gln	
			100					105					110			
gaa	atc	aac	cag	aat	ttg	gct	gag	gag	gct	ggt	ctg	aac	atc	act	cac	384
Glu	Ile	Asn	Gln	Asn	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Leu	Asn	Ile	Thr	His	
		115					120					125				
att	tgc	ctc	cct	cca	gat	agc	agt	gaa	gcc	gag	att	ata	gat	gaa	atc	432
Ile	Cys	Leu	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Glu	Ile	
	130					135					140					
tta	aag	atc	aat	gaa	gat	acc	aga	gta	cat	ggc	ctt	gcc	ctt	cag	atc	480
Leu	Lys	Ile	Asn	Glu	Asp	Thr	Arg	Val	His	Gly	Leu	Ala	Leu	Gln	Ile	
145					150					155				160		
tct	gag	aac	ttg	ttt	agc	aac	aaa	gtc	ctc	aat	gcc	ttg	aaa	cca	gaa	528
Ser	Glu	Asn	Leu	Phe	Ser	Asn	Lys	Val	Leu	Asn	Ala	Leu	Lys	Pro	Glu	
			165					170						175		
aaa	gat	gtg	gat	gga	gta	aca	gac	ata	aac	ctg	ggg	aag	ctg	gtg	cga	576
Lys	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Thr	Asp	Ile	Asn	Leu	Gly	Lys	Leu	Val	Arg	
		180						185					190			
ggg	gat	gcc	cat	gaa	tgt	ttt	gtt	tca	cct	gtt	gcc	aaa	gct	gta	att	624
Gly	Asp	Ala	His	Glu	Cys	Phe	Val	Ser	Pro	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Ile	
	195					200						205				
gaa	ctt	ctt	gaa	aaa	tca	ggt	gtc	aac	cta	gat	gga	aag	aag	att	ttg	672
Glu	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	Leu	
	210					215					220					
gta	gtg	ggg	gcc	cat	ggg	tct	ttg	gaa	gct	gct	cta	caa	tgc	ctg	ttc	720
Val	Val	Gly	Ala	His	Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Cys	Leu	Phe	
225					230					235				240		
cag	aga	aaa	ggg	tcc	atg	aca	atg	agc	atc	cag	tgg	aaa	aca	cgc	cag	768
Gln	Arg	Lys	Gly	Ser	Met	Thr	Met	Ser	Ile	Gln	Trp	Lys	Thr	Arg	Gln	
			245					250						255		
ctt	caa	agc	aag	ctt	cac	gag	gct	gac	att	gtg	gtc	cta	ggc	tca	cct	816
Leu	Gln	Ser	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Ile	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Pro	
		260						265					270			
aag	cca	gaa	gag	att	ccc	ctt	act	tgg	ata	caa	cca	gga	act	act	gtt	864
Lys	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Trp	Ile	Gln	Pro	Gly	Thr	Thr	Val	
		275					280					285				

ctc aac tgc tcc cat gac ttc ctg tca ggg aag gtt ggg tgt ggc tct Leu Asn Cys Ser His Asp Phe Leu Ser Gly Lys Val Gly Cys Gly Ser 290 295 300	912
cca aga ata cat ttt ggt gga ctc att gag gaa gat gat gtg att ctc Pro Arg Ile His Phe Gly Gly Leu Ile Glu Glu Asp Asp Val Ile Leu 305 310 315 320	960
ctt gct gca gct ctg cga att cag aac atg gtc agt agt gga agg aga Leu Ala Ala Ala Leu Arg Ile Gln Asn Met Val Ser Ser Gly Arg Arg 325 330 335	1008
tgg ctt cgt gaa cag cag cac agg cgg tgg aga ctt cac tgc ttg aaa Trp Leu Arg Glu Gln Gln His Arg Arg Trp Arg Leu His Cys Leu Lys 340 345 350	1056
ctt cag cct ctc tcc cct gtg cca agt gac att gag att tca aga gga Leu Gln Pro Leu Ser Pro Val Pro Ser Asp Ile Glu Ile Ser Arg Gly 355 360 365	1104
caa act cca aaa gct gtg gat gtc ctt gcc aag gag att gga ttg ctt Gln Thr Pro Lys Ala Val Asp Val Leu Ala Lys Glu Ile Gly Leu Leu 370 375 380	1152
gca gat gaa att gaa atc tat ggc aaa agc aaa gcc aaa gta cgt ttg Ala Asp Glu Ile Glu Ile Tyr Gly Lys Ser Lys Ala Lys Val Arg Leu 385 390 395 400	1200
tcc gtg cta gaa agg tta aag gat caa gca gat gga aaa tac gtc tta Ser Val Leu Glu Arg Leu Lys Asp Gln Ala Asp Gly Lys Tyr Val Leu 405 410 415	1248
gtt gct ggg atc aca ccc acc cct ctt gga gaa ggg aag agc aca gtc Val Ala Gly Ile Thr Pro Thr Pro Leu Gly Glu Gly Lys Ser Thr Val 420 425 430	1296
acc atc ggg ctt gtg cag gct ctg acc gca cac ctg aat gtc aac tcc Thr Ile Gly Leu Val Gln Ala Leu Thr Ala His Leu Asn Val Asn Ser 435 440 445	1344
ttt gcc tgc ttg agg cag cct tcc caa gga ccg acg ttt gga gtg aaa Phe Ala Cys Leu Arg Gln Pro Ser Gln Gly Pro Thr Phe Gly Val Lys 450 455 460	1392
gga gga gcc gcg ggt ggt gga tat gcc cag gtc atc ccc atg gag gag Gly Gly Ala Ala Gly Gly Tyr Ala Gln Val Ile Pro Met Glu Glu 465 470 475 480	1440
ttc aac ctt cac ttg act gga gac atc cac gcc atc acc gct gcc aat	1488



Phe Asn Leu His Leu Thr Gly Asp Ile His Ala Ile Thr Ala Ala Asn	
485 490 495	
aac ttg ctg gct gcc gcc atc gac acg agg att ctt cat gaa aac acg	1536
Asn Leu Leu Ala Ala Ala Ile Asp Thr Arg Ile Leu His Glu Asn Thr	
500 505 510	
caa aca gat aag gct ctg tat aat cgg ctg gtt cct tta gtg aat ggt	1584
Gln Thr Asp Lys Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Val Pro Leu Val Asn Gly	
515 520 525	
gtc aga gaa ttt tca gaa att cag ctt gct cgg cta aaa aaa ctg gga	1632
Val Arg Glu Phe Ser Glu Ile Gln Leu Ala Arg Leu Lys Lys Leu Gly	
530 535 540	
ata aat aag act gat ccg agc aca ctg aca gaa gag gaa gtg agt aaa	1680
Ile Asn Lys Thr Asp Pro Ser Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Lys	
545 550 555 560	
ttt gcc cgt ctc gac atc gac cca tct acc atc acg tgg cag aga gta	1728
Phe Ala Arg Leu Asp Ile Asp Pro Ser Thr Ile Thr Trp Gln Arg Val	
565 570 575	
ttg gat aca aat gac cga ttt cta cga aaa ata acc atc ggg cag gga	1776
Leu Asp Thr Asn Asp Arg Phe Leu Arg Lys Ile Thr Ile Gly Gln Gly	
580 585 590	
aac aca gag aag ggc cat tac cgg cag gcg cag ttt gac atc gca gtg	1824
Asn Thr Glu Lys Gly His Tyr Arg Gln Ala Gln Phe Asp Ile Ala Val	
595 600 605	
gcc agc gag atc atg gcg gtg ctg gcc ctg acg gac agc ctc gca gac	1872
Ala Ser Glu Ile Met Ala Val Leu Ala Leu Thr Asp Ser Leu Ala Asp	
610 615 620	
atg aag gca cgg ctg gga agg atg gtg gtg gcc agt gac aaa agc ggg	1920
Met Lys Ala Arg Leu Gly Arg Met Val Val Ala Ser Asp Lys Ser Gly	
625 630 635 640	
cag cct gtg aca gca gat gat ttg ggg gtg aca ggt gct ttg aca gtt	1968
Gln Pro Val Thr Ala Asp Asp Leu Gly Val Thr Gly Ala Leu Thr Val	
645 650 655	
ttg atg aaa gat gca ata aaa cca aac ctg atg cag acc ctg gaa ggg	2016
Leu Met Lys Asp Ala Ile Lys Pro Asn Leu Met Gln Thr Leu Glu Gly	
660 665 670	
aca cct gtg ttc gtg cat gcg ggc cct ttt gct aac att gct cac ggc	2064
Thr Pro Val Phe Val His Ala Gly Pro Phe Ala Asn Ile Ala His Gly	
675 680 685	

aac tct tca gtg ttg gct gat aaa att gcc ctg aaa ctg gtt ggt gaa Asn Ser Ser Val Leu Ala Asp Lys Ile Ala Leu Lys Leu Val Gly Glu 690 695 700	2112
gaa gga ttt gta gtg acc gaa gct ggc ttt ggt gct gac atc gga atg Glu Gly Phe Val Val Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ala Asp Ile Gly Met 705 710 715 720	2160
gag aaa ttc ttc aac atc aag tgc cga gct tcc ggc ttg gtg ccc aac Glu Lys Phe Phe Asn Ile Lys Cys Arg Ala Ser Gly Leu Val Pro Asn 725 730 735	2208
gtg gtt gtg tta gtg gca acg gtg cga gct ctg aag atg cat gga ggc Val Val Val Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Leu Lys Met His Gly Gly 740 745 750	2256
ggg cca agt gta acg gct ggt gtt cct ctt aag aaa gaa tat aca gag Gly Pro Ser Val Thr Ala Gly Val Pro Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Glu 755 760 765	2304
gag aac atc cag ctg gtg gca gac ggc tgc tgt aac ctc cag aag caa Glu Asn Ile Gln Leu Val Ala Asp Gly Cys Cys Asn Leu Gln Lys Gln 770 775 780	2352
att cag atc act cag ctc ttt ggg gtt ccc gtt gtg gtg gct ctg aat Ile Gln Ile Thr Gln Leu Phe Gly Val Pro Val Val Val Ala Leu Asn 785 790 795 800	2400
gtc ttc aag acc gac acc cgc gct gag att gac ttg gtg tgt gag ctt Val Phe Lys Thr Asp Thr Arg Ala Glu Ile Asp Leu Val Cys Glu Leu 805 810 815	2448
gca aag cgg gct ggt gcc ttt gat gca gtc ccc tgc tat cac tgg tgc Ala Lys Arg Ala Gly Ala Phe Asp Ala Val Pro Cys Tyr His Trp Ser 820 825 830	2496
gtt ggt gga aaa gga tcg gtg gac ttg gct cgg gct gtg aga gag gct Val Gly Gly Lys Gly Ser Val Asp Leu Ala Arg Ala Val Arg Glu Ala 835 840 845	2544
gcg agt aaa aga agc cga ttc cag ttc ctg tat gat gtt cag gtt cca Ala Ser Lys Arg Ser Arg Phe Gln Phe Leu Tyr Asp Val Gln Val Pro 850 855 860	2592
att gtg gac aag ata agg acc att gct cag gct gtc tat gga gcc aaa Ile Val Asp Lys Ile Arg Thr Ile Ala Gln Ala Val Tyr Gly Ala Lys 865 870 875 880	2640
gat att gaa ctc tct cct gag gca caa gcc aaa ata gat cgt tac act	2688

Asp Ile Glu Leu Ser Pro Glu Ala Gln Ala Lys Ile Asp Arg Tyr Thr	
885 890 895	
caa cag ggt ttt gga aat ttg ccc atc tgc atg gca aag acc cac ctt	2736
Gln Gln Gly Phe Gly Asn Leu Pro Ile Cys Met Ala Lys Thr His Leu	
900 905 910	
tct cta tct cac caa cct gac aaa aaa ggt gtg cca agg gac ttc atc	2784
Ser Leu Ser His Gln Pro Asp Lys Lys Gly Val Pro Arg Asp Phe Ile	
915 920 925	
tta cct atc agt gac gtc cgg gcc agc ata ggc gct ggg ttc att tac	2832
Leu Pro Ile Ser Asp Val Arg Ala Ser Ile Gly Ala Gly Phe Ile Tyr	
930 935 940	
cct ttg gtc gga acg atg agc acc atg cca gga ctg ccc acc cgg ccc	2880
Pro Leu Val Gly Thr Met Ser Thr Met Pro Gly Leu Pro Thr Arg Pro	
945 950 955 960	
tgc ttt tat gac ata gat ctt gat acc gaa aca gaa caa gtt aaa ggc	2928
Cys Phe Tyr Asp Ile Asp Leu Asp Thr Glu Thr Glu Gln Val Lys Gly	
965 970 975	
ttg ttc	2934
Leu Phe	

<210> 2  
 <211> 978  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Thr Arg Leu Pro Leu Val Leu Arg Gln Leu Arg Arg Pro Pro	
1 5 10 15	
Gln Pro Pro Gly Pro Pro Arg Arg Leu Arg Val Pro Cys Arg Ala Ser	
20 25 30	
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Gly Leu Leu Gly	
35 40 45	
Gln Arg Arg Pro Gln Asp Gly Gln Ala Arg Ser Ser Cys Ser Pro Gly	
50 55 60	

Gly Arg Thr Pro Ala Ala Arg Asp Ser Ile Val Arg Glu Val Ile Gln  
65 70 75 80

Asn Ser Lys Glu Val Leu Ser Leu Leu Gln Glu Lys Asn Pro Ala Phe  
85 90 95

Lys Pro Val Leu Ala Ile Ile Gln Ala Gly Asp Asp Asn Leu Met Gln  
100 105 110

Glu Ile Asn Gln Asn Leu Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asn Ile Thr His  
115 120 125

Ile Cys Leu Pro Pro Asp Ser Ser Glu Ala Glu Ile Ile Asp Glu Ile  
130 135 140

Leu Lys Ile Asn Glu Asp Thr Arg Val His Gly Leu Ala Leu Gln Ile  
145 150 155 160

Ser Glu Asn Leu Phe Ser Asn Lys Val Leu Asn Ala Leu Lys Pro Glu  
165 170 175

Lys Asp Val Asp Gly Val Thr Asp Ile Asn Leu Gly Lys Leu Val Arg  
180 185 190

Gly Asp Ala His Glu Cys Phe Val Ser Pro Val Ala Lys Ala Val Ile  
195 200 205

Glu Leu Leu Glu Lys Ser Gly Val Asn Leu Asp Gly Lys Lys Ile Leu  
210 215 220

Val Val Gly Ala His Gly Ser Leu Glu Ala Ala Leu Gln Cys Leu Phe  
225 230 235 240

Gln Arg Lys Gly Ser Met Thr Met Ser Ile Gln Trp Lys Thr Arg Gln  
245 250 255

Leu Gln Ser Lys Leu His Glu Ala Asp Ile Val Val Leu Gly Ser Pro

260

265

270

Lys Pro Glu Glu Ile Pro Leu Thr Trp Ile Gln Pro Gly Thr Thr Val  
275 280 285

Leu Asn Cys Ser His Asp Phe Leu Ser Gly Lys Val Gly Cys Gly Ser  
290 295 300

Pro Arg Ile His Phe Gly Gly Leu Ile Glu Glu Asp Asp Val Ile Leu  
305 310 315 320

Leu Ala Ala Ala Leu Arg Ile Gln Asn Met Val Ser Ser Gly Arg Arg  
325 330 335

Trp Leu Arg Glu Gln Gln His Arg Arg Trp Arg Leu His Cys Leu Lys  
340 345 350

Leu Gln Pro Leu Ser Pro Val Pro Ser Asp Ile Glu Ile Ser Arg Gly  
355 360 365

Gln Thr Pro Lys Ala Val Asp Val Leu Ala Lys Glu Ile Gly Leu Leu  
370 375 380

Ala Asp Glu Ile Glu Ile Tyr Gly Lys Ser Lys Ala Lys Val Arg Leu  
385 390 395 400

Ser Val Leu Glu Arg Leu Lys Asp Gln Ala Asp Gly Lys Tyr Val Leu  
405 410 415

Val Ala Gly Ile Thr Pro Thr Pro Leu Gly Glu Gly Lys Ser Thr Val  
420 425 430

Thr Ile Gly Leu Val Gln Ala Leu Thr Ala His Leu Asn Val Asn Ser  
435 440 445

Phe Ala Cys Leu Arg Gln Pro Ser Gln Gly Pro Thr Phe Gly Val Lys  
450 455 460

Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Ala Gln Val Ile Pro Met Glu Glu  
465 470 475 480

Phe Asn Leu His Leu Thr Gly Asp Ile His Ala Ile Thr Ala Ala Asn  
485 490 495

Asn Leu Leu Ala Ala Ala Ile Asp Thr Arg Ile Leu His Glu Asn Thr  
500 505 510

Gln Thr Asp Lys Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Val Pro Leu Val Asn Gly  
515 520 525

Val Arg Glu Phe Ser Glu Ile Gln Leu Ala Arg Leu Lys Lys Leu Gly  
530 535 540

Ile Asn Lys Thr Asp Pro Ser Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Lys  
545 550 555 560

Phe Ala Arg Leu Asp Ile Asp Pro Ser Thr Ile Thr Trp Gln Arg Val  
565 570 575

Leu Asp Thr Asn Asp Arg Phe Leu Arg Lys Ile Thr Ile Gly Gln Gly  
580 585 590

Asn Thr Glu Lys Gly His Tyr Arg Gln Ala Gln Phe Asp Ile Ala Val  
595 600 605

Ala Ser Glu Ile Met Ala Val Leu Ala Leu Thr Asp Ser Leu Ala Asp  
610 615 620

Met Lys Ala Arg Leu Gly Arg Met Val Val Ala Ser Asp Lys Ser Gly  
625 630 635 640

Gln Pro Val Thr Ala Asp Asp Leu Gly Val Thr Gly Ala Leu Thr Val  
645 650 655

Leu Met Lys Asp Ala Ile Lys Pro Asn Leu Met Gln Thr Leu Glu Gly

660

665

670

Thr Pro Val Phe Val His Ala Gly Pro Phe Ala Asn Ile Ala His Gly  
675 680 685

Asn Ser Ser Val Leu Ala Asp Lys Ile Ala Leu Lys Leu Val Gly Glu  
690 695 700

Glu Gly Phe Val Val Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ala Asp Ile Gly Met  
705 710 715 720

Glu Lys Phe Phe Asn Ile Lys Cys Arg Ala Ser Gly Leu Val Pro Asn  
725 730 735

Val Val Val Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Leu Lys Met His Gly Gly  
740 745 750

Gly Pro Ser Val Thr Ala Gly Val Pro Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Glu  
755 760 765

Glu Asn Ile Gln Leu Val Ala Asp Gly Cys Cys Asn Leu Gln Lys Gln  
770 775 780

Ile Gln Ile Thr Gln Leu Phe Gly Val Pro Val Val Val Ala Leu Asn  
785 790 795 800

Val Phe Lys Thr Asp Thr Arg Ala Glu Ile Asp Leu Val Cys Glu Leu  
805 810 815

Ala Lys Arg Ala Gly Ala Phe Asp Ala Val Pro Cys Tyr His Trp Ser  
820 825 830

Val Gly Gly Lys Gly Ser Val Asp Leu Ala Arg Ala Val Arg Glu Ala  
835 840 845

Ala Ser Lys Arg Ser Arg Phe Gln Phe Leu Tyr Asp Val Gln Val Pro  
850 855 860

Ile Val Asp Lys Ile Arg Thr Ile Ala Gln Ala Val Tyr Gly Ala Lys  
865 870 875 880

Asp Ile Glu Leu Ser Pro Glu Ala Gln Ala Lys Ile Asp Arg Tyr Thr  
885 890 895

Gln Gln Gly Phe Gly Asn Leu Pro Ile Cys Met Ala Lys Thr His Leu  
900 905 910

Ser Leu Ser His Gln Pro Asp Lys Lys Gly Val Pro Arg Asp Phe Ile  
915 920 925

Leu Pro Ile Ser Asp Val Arg Ala Ser Ile Gly Ala Gly Phe Ile Tyr  
930 935 940

Pro Leu Val Gly Thr Met Ser Thr Met Pro Gly Leu Pro Thr Arg Pro  
945 950 955 960

Cys Phe Tyr Asp Ile Asp Leu Asp Thr Glu Thr Glu Gln Val Lys Gly  
965 970 975

Leu Phe

<210> 3  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
cgggatccgc catgggcacg cgtctgccgc tcgtcctg

38

<210> 4  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
ccgctcgagg aacaagcctt taacttggtc tgtttcgg

38



<210> 5  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

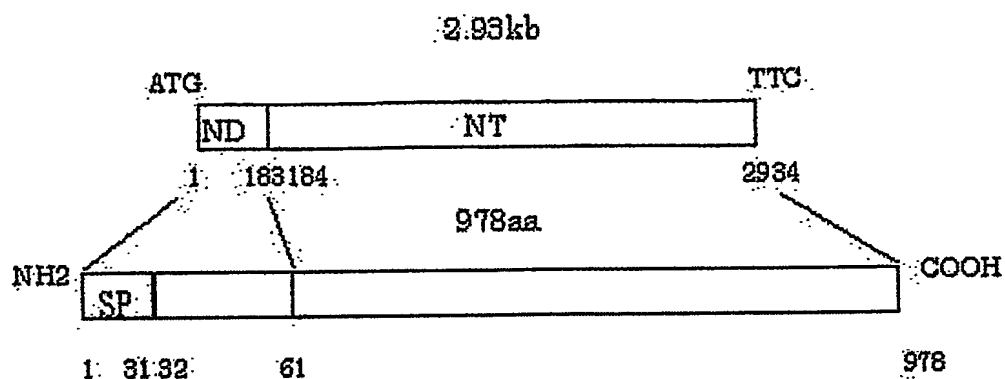
<400> 5  
 gcttttggtgc tgacatcgga atg 23

<210> 6  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 cccggacgtc actgataggt aag 23

【書類名】 図面

【図 1】

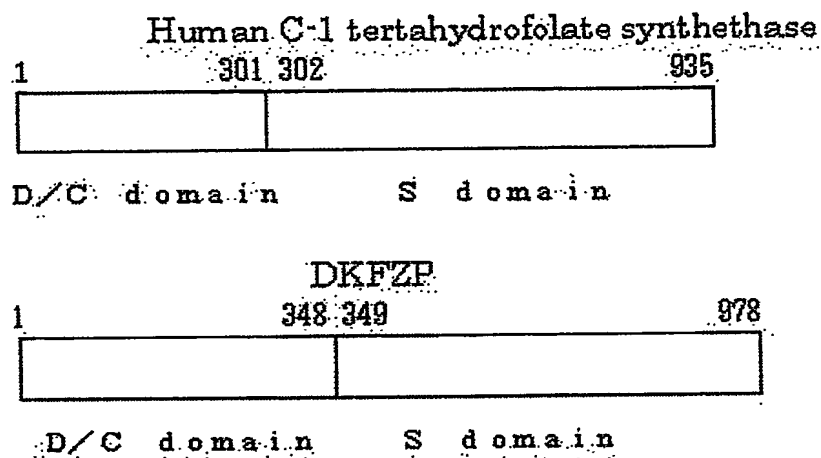


ND: N末端部分DNA

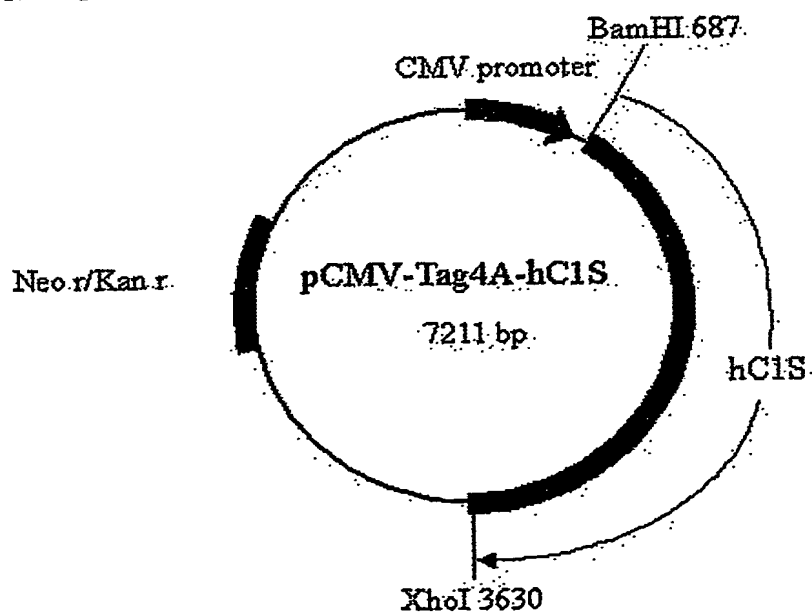
NT: N末端欠損DNA

SP: ターゲット配列 (シグナルペプチド)

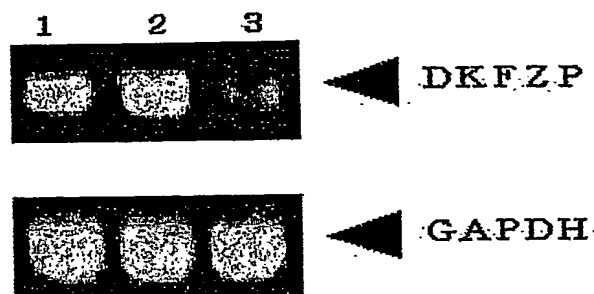
【図 2】



【図 3】



【図 4】



1:大腸癌細胞HCT116

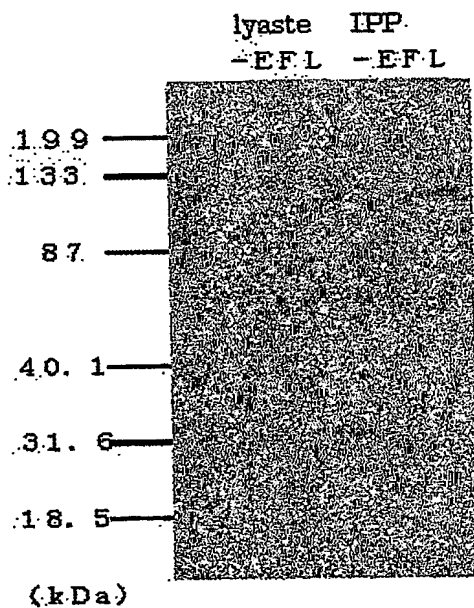
2:大腸癌細胞SW620

3:正常大腸細胞CCD841CON

DKFZP: 本発明で提供される遺伝子の発現量

GAPDH: グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素の発現量

【図 5】

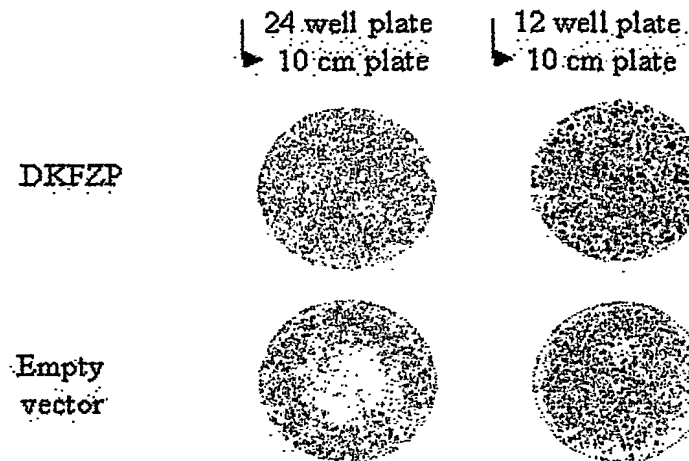


-: 遺伝子導入されない動物細胞由来のサンプル

E: pCMV-Tag4Vectorが導入された動物細胞由来のサンプル

FL: 本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4Vectorが導入された動物細胞由来のサンプル

【図 6】



DKFZP: 本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換え pCMV-Tag4 Vector が導入された動物細胞の増殖

Empty: vector: pCMV-Tag4 Vector が導入された動物細胞の増殖

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規テトラヒドロ葉酸合成酵素遺伝子および該遺伝子がコードする蛋白質を見出し、該蛋白質の細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法を提供し、大腸癌の判定方法、防止方法および治療方法を提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA、該 DNA に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド、該 DNA がコードする蛋白質、該 DNA を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含有する形質転換体、該蛋白質に対する抗体、該蛋白質の製造方法、該蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法、該 DNA の発現量を測定することを特徴とする大腸癌の判定方法、大腸癌の判定キット、大腸癌の防止剤および治療剤。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 4 1 2 4 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 2 8 3 1 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 8 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋 3 丁目 1 4 番 1 0 号
氏 名	第一製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**